

活血胶囊对兔动脉粥样硬化斑块血管内皮细胞生长因子和血管细胞黏附分子-1 表达的影响

任得志^{1,2}, 刘勤社^{2*}, 李静³, 申仙丽²

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 陕西省中医医院, 西安 710003;
3. 陕西省人民医院, 西安 710068)

[摘要] **目的:**探讨活血胶囊对兔动脉粥样硬化斑块的作用及其稳定动脉粥样硬化斑块的机制。**方法:**53 只健康雄性日本大耳白兔随机分为空白组及实验组。空白组喂普通饲料,实验组喂高脂饲料,10 周末,检测血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C);随后将实验组兔分为 4 组:模型组,辛伐他汀($2.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),活血胶囊高($1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、低剂量组($0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),同时继续喂高脂饲料。20 周末,检测血清 TC, TG, LDL-C, 处死动物,取主动脉标本,测定内膜/中膜厚度比,用免疫组化法检测血管内皮细胞生长因子(VEGF),血管内皮细胞黏附分子-1(VCAM-1)在动脉斑块中的表达。**结果:**与正常组比较,模型组血清 TC, TG, LDL-C, 内膜/中膜厚度比, VEGF, VCAM-1 在动脉斑块中的表达显著升高,差异具有显著性($P < 0.01$);与模型组比较,活血胶囊组 TC, TG, LDL-C, 主动脉内膜/中膜厚度比均明显低于模型组($P < 0.05$);高剂量组与低剂量组比较,差异具有显著性($P < 0.05$);免疫组化染色发现模型组、活血胶囊高、低剂量组、辛伐他汀组均可见染成黄褐色的 VEGF, VCAM-1 阳性表达信号,主要存在于粥样斑块区,空白组家兔主动脉 VEGF 及 VCAM-1 阳性表达几乎为零,积分吸光度结果提示 3 个药物干预组表达均比模型组减少($P < 0.01, P < 0.05$)。**结论:**活血胶囊可抑制 VEGF, VCAM-1 在兔胸主动脉的表达,抑制血管新生和炎症反应,这可能是该药延缓 AS 进程,稳定斑块的作用机制之一。

[关键词] 活血胶囊; 动脉粥样硬化; 血管内皮细胞生长因子; 血管细胞黏附分子-1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0167-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210167

Effects of Huoxue Capsule on Expression of VEGF and VCAM-1 in Rabbits with Arteriosclerosis

REN De-zhi^{1,2}, LIU Qin-she^{2*}, LI Jing³, SHEN Xian-li²

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;
2. Shaanxi Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China;
3. Shaanxi People's Hospital, Xi'an 710068, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Huoxue capsule on atherosclerotic plaque in rabbits and explore the possible mechanism of stabilizing atherosclerotic plaque. **Method:** Fifty-three healthy male rabbits were randomly divided into two groups. The rabbits in blank group were fed with common forage. The rabbits in experimental group were fed with high lipid forage. After 10 weeks, rabbits in experimental group were randomly chose to be dissected and atherosclerotic plaque was found and high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) level in the blood was examined to verify whether the model is completed. Then all rabbits in model group were randomly divided into 4 groups: including the model group, the positive control group, and the groups of high and low dose Huoxue capsule, which were fed high lipid forage and blank group fed common forage continuously. Twenty weeks

[收稿日期] 20140503(004)

[基金项目] 陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项计划(2009ZDKG-85)

[第一作者] 任得志, 硕士, 从事心血管方面的研究, Tel:029-87251791, E-mail:rendz2001@163.com

[通讯作者] *刘勤社, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 从事心血管方面的研究, Tel:029-87253052

later, blood samples were collected to determine the serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and HDL-C, the thickness ratio of intima and tunica media were measured and the expression intensity of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in the thoracic aorta was determined with immunohistochemical staining. **Result:** After treatment, the serum levels of TC, TG, LDL-C, and the intima/tunica media thickness ratio significantly reduced ($P < 0.05$). There was a significant difference between the groups of high dose and low dose of Huoxue capsule ($P < 0.05$). Positive expressions of VEGF and VCAM-1 found was in the model group, high-dose and low-dose of Huoxue capsule, and the simvastatin one. The expressions mainly existed in the atherosclerotic plaque, but there was no positive expressions of VEGF and VCAM-1 in the blank group. The results of integral optical density suggested that the expressions in treatment groups were decreased compared with the model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion:** Huoxue capsule can inhibit the expressions of VEGF and VCAM-1 in the thoracic aorta of the rabbits, and this maybe a mechanism in postponing the process of the atherosclerosis and stabilizing atheromatous plaque.

[**Key words**] Huoxue capsule; atherosclerotic; vascular endothelial growth factor; vascular cell adhesion molecule 1

不稳定斑块的破裂导致冠状动脉腔内血栓形成是急性冠脉综合征(ACS)发生的主要机制,斑块内血管新生和黏附作用都是斑块局部炎症反应的主要表现,二者均可增强炎症反应、扩大脂质核心、激发氧化应激反应和斑块破裂^[1],导致 ACS 的发生,血管内皮细胞生长因子(VEGF)是目前已知最主要的诱导血管发生的生长因子^[2],细胞黏附分子(CAM)是一类调节细胞和细胞间以及细胞和基质间黏附作用的膜表面糖蛋白,其中以血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)最为重要。这种黏附作用是斑块局部炎症反应的起始因素,并贯穿了 AS 的整个过程。本文旨在通过建立兔 AS 模型,用病理和免疫组织化学法观察活血胶囊对 VEGF 和 VCAM-1 在动脉粥样硬化(AS)斑块内的表达,探讨其干预 AS 的作用机制。

1 材料

1.1 动物及饲料 雄性纯种日本大耳白兔 53 只,体重 1.5 ~ 2.5 kg,由西安交通大学医学院实验中心提供,动物合格证号 SCXK(陕)2007-009;高脂饲料的配制:家兔普通饲料配方中添加 1% 胆固醇,5% 猪油,7.5% 蛋黄粉。

1.2 药品 活血胶囊,由黄芪、桃仁、红花、牛膝、酸枣仁、川芎、赤芍、枳壳、地黄、桔梗、当归、甘草组成,各味药按比例混匀,用正交实验获得最佳提取条件,浓缩干燥后装胶囊,采用薄层色谱法对方中各药进行定性鉴别,按药典要求对该制剂进行检查,并建立 HPLC 对制剂中黄芪皂苷、羟基红花黄素、芍药苷进行含量测定,西安大唐制药公司生产并提供实验用药,每粒净重 0.35 g,批号 B20020306;辛伐他汀片

(杭州默沙东制药有限公司,批号 07283)。

1.3 试剂 兔抗兔 VEGF 多克隆抗体(批号 K1504),VCAM-1 多克隆抗体(批号 50581654)(武汉博士德生物工程有限公司),浓缩型 DAB 试剂盒(中山生物试剂公司),总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒(天津市英博生化试剂有限公司,批号 070703)。

1.4 仪器 7170 型全自动生化分析仪(日本日立公司产品),Motic Biseres 型普通光学显微镜(日本 Olympus 公司),Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统(A)(厦门麦克奥迪有限责任公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 53 只健康雄性日本大耳白兔随机分为空白组及实验组。空白组喂普通饲料,实验组喂高脂饲料,于第 10 周末,检测血清 TC, TG, LDL-C;随机选取 3 只实验组兔在麻醉状态下,剥离升主动脉全长,剖开血管,血管壁均可见明显隆起斑块,表明模型建立成功。随后依据随机数字表将实验组兔分为 4 组:模型组、辛伐他汀组、活血胶囊高、低剂量组,继续喂饲高脂饲料。同时依据每只实验兔的体重,参照动物与人体每公斤体重等效剂量折算系数计算药物具体剂量,活血胶囊高、低剂量组,辛伐他汀组分别为 1.5, 0.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 及 2.2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,药物干预 10 周,定时称量体重变化,调整用药。

2.2 指标测定及方法

2.2.1 血脂测定 分别于用药前(第 10 周)、实验结束处死动物前(第 20 周)留取血清标本,用全自动生化分析仪测定。

2.2.2 主动脉病变病理学检查 麻醉实验兔,剖开胸、腹腔,游离主动脉全长,取自降主动脉起始处至髂总动脉分叉处主动脉,去除多余脂肪组织及结缔组织,冲洗干净后置于4%多聚甲醛中固定24 h。自降主动脉起始部向下取1.5 cm长度,常规乙醇脱水、透明、石蜡包埋,连续超薄切片,进行苏木素伊红染色。光镜下观察主动脉横切面形态特征,并按文献报道的方法^[3]测定主动脉内膜/中膜厚度比值。

2.2.3 主动脉 VEGF 和 VCAM-1 检测 VEGF 和 VCAM-1 均采用 S-P 法,按免疫组化试剂盒说明进行免疫组化染色,每例切片随机观察 10 个不重叠的 400 倍视野, Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统

(A) 计算 VEGF, VCAM-1 阳性染色面积与染色强弱相结合的积分吸光度 (IA) 作为每只实验兔的检测值,取每组实验兔的平均值,然后通过统计学方法进行半定量分析。

2.3 统计学分析 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 分析软件,计量资料分析采用 *t* 检验及方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

3 结果

3.1 血脂水平 检测结果显示模型组血脂在第 10 周和第 20 周均明显高于空白组 ($P < 0.01$), 结合病理观察,说明造模成功。用药后各药物处理组 TC, TG, LDL-C 均低于模型组,以高剂量组及辛伐他汀组降低最为显著 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 活血胶囊对家兔血脂各指标水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹		TG/mmol·L ⁻¹		LDL-C/mmol·L ⁻¹	
			用药前	用药后	用药前	用药后	用药前	用药后
空白	10	-	1.95 ± 0.52	2.06 ± 0.17	0.58 ± 0.13	0.62 ± 0.09	1.10 ± 0.41	1.23 ± 0.84
模型	8	-	21.09 ± 0.73 ¹⁾	22.49 ± 1.27 ¹⁾	8.28 ± 0.97 ¹⁾	8.41 ± 0.70 ¹⁾	12.21 ± 1.38 ¹⁾	12.65 ± 1.61 ¹⁾
活血胶囊	9	1.5	21.81 ± 1.66 ¹⁾	14.93 ± 0.88 ^{1,2,3)}	8.01 ± 0.91 ¹⁾	3.41 ± 0.90 ^{1,2,3)}	11.98 ± 1.96 ¹⁾	8.23 ± 0.95 ^{1,2,3)}
	7	0.5	21.22 ± 2.36 ¹⁾	18.59 ± 1.52 ^{1,2,4)}	8.11 ± 1.14 ¹⁾	5.54 ± 0.68 ^{1,2,4)}	12.34 ± 1.18 ¹⁾	10.65 ± 0.91 ^{1,2)}
辛伐他汀	8	2.2 × 10 ⁻³	20.95 ± 2.06 ¹⁾	13.22 ± 1.44 ^{1,2,3)}	7.99 ± 1.32 ¹⁾	3.24 ± 0.92 ^{1,2,3)}	12.41 ± 1.14 ¹⁾	6.87 ± 1.39 ^{1,2,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与活血低剂量比较³⁾ $P < 0.01$;与辛伐他汀组相比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 各组主动脉内膜/中膜厚度比及 VEGF, VCAM-1 的表达 与高脂模型组相比,各药物干预组主动脉内膜/中膜厚度比均显著减低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),提示活血胶囊、辛伐他汀具有抑制兔主动脉内膜增生的作用,其中活血胶囊高、低剂量组比较,有显著性差异 ($P < 0.05$),高剂量组与辛伐他汀组比较,差异无显著意义 (表 2)。VEGF, VCAM-1

的表达空白组家兔主动脉阳性表达几乎为零,模型组、活血胶囊高、低剂量组、辛伐他汀组均可见染成黄褐色的 VEGF, VCAM-1 阳性表达信号,主要存在于粥样斑块区,在内皮细胞、巨噬细胞及细胞外间质也有表达,积分吸光度结果提示 3 个药物干预组表达均比模型组减少 ($P < 0.01$, $P < 0.05$) (表 2, 图 1, 2)。

表 2 实验第 20 周末各组动物主动脉内膜/中膜厚度比及 VEGF, VCAM-1 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	内膜厚度/中膜厚度	VEGF/IA	VCAM-1/IA
空白	10	-	0.10 ± 0.09 ¹⁾	-	-
模型	8	-	0.88 ± 0.07 ¹⁾	50.39 ± 5.79	41.00 ± 3.21
活血胶囊	9	1.5	0.41 ± 0.03 ^{1,2,3)}	23.78 ± 3.22 ^{2,3)}	17.04 ± 2.2 ^{2,3)}
	7	0.5	0.65 ± 0.07 ^{1,2,4)}	37.09 ± 9.60 ^{2,4)}	30.14 ± 3.54 ^{2,4)}
辛伐他汀组	8	2.2 × 10 ⁻³	0.39 ± 0.05 ^{1,2)}	21.96 ± 4.99 ²⁾	15.92 ± 2.89 ²⁾

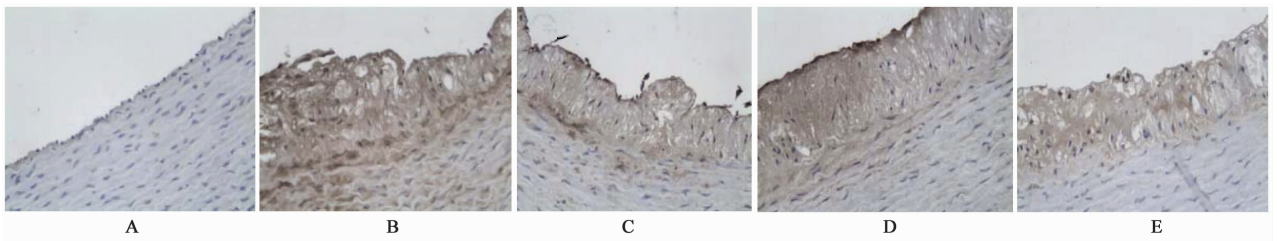
注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与活血低剂量比较³⁾ $P < 0.05$;与辛伐他汀组相比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

活血胶囊是由黄芪、桃仁、红花、牛膝、酸枣仁、川芎、赤芍、枳壳、地黄、桔梗、当归、甘草 12 味组成,具有益气活血、养心安神等功效。前期临床研究^[4-5]表明可改善老年人虚衰、瘀滞的多种症状,降

低全血黏度,解除红细胞和血小板聚集,且有一定的调整血脂的疗效。本实验结果发现活血胶囊可降低血清 TC, TG, LDL-C 水平,与临床报道相一致,其作用机制可能与提高血浆代谢相关酶的活性有关^[6]。

斑块内血管新生是 AS 重要的病理学特征之



A. 空白组; B. 模型组; C. 活血胶囊 $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组; D. 活血胶囊 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组; E. 辛伐他汀 $2.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组(图 2 同)

图 1 实验第 20 周末各组动物主动脉 VEGF 表达(免疫组织化学染色, $\times 400$)

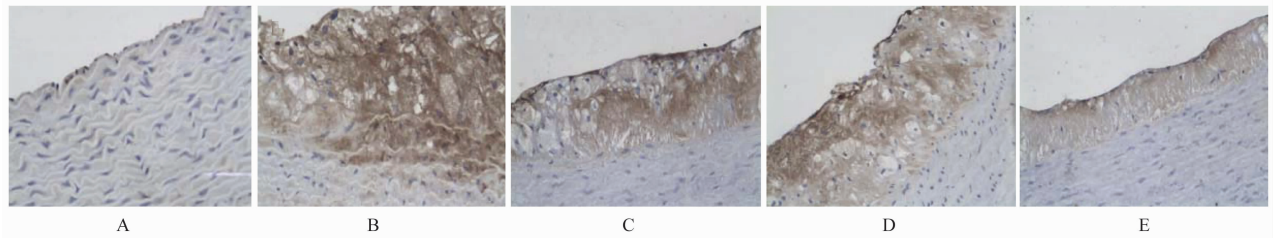


图 2 实验第 20 周末各组动物主动脉 VCAM-1 表达(免疫组织化学染色, $\times 400$)

一,其临床意义在于导致斑块的不稳定及破裂出血,继而引发严重心血管事件^[7], VEGF 是目前已知最强的诱导血管发生的生长因子,对斑块内血管新生具有直接的促进作用,进而在 AS 的发生发展中具有重要意义。现已证实其在 AS 斑块中的表达显著增加,促进斑块的发生与发展,其可能的机制是增加斑块毛细血管密度并加重动脉管腔的狭窄程度^[8]。VCAM-1 属免疫球蛋白超家族成员,在介导单核细胞与血管内皮细胞黏附方面起极其重要的作用。AS 病变早期,VCAM-1 主要是促单核细胞向内皮黏附、迁移^[9];在进展期,VCAM-1 增加细胞与细胞间的相互作用,使单核细胞迁移入内皮下,变为巨噬细胞,进而摄取脂质演变为泡沫细胞,并向淋巴细胞提供抗原,触发免疫反应,释放多种炎症因子,促进平滑肌细胞表型转化和增殖,形成纤维斑块^[10]。随着病程的进展,VCAM-1 介导更多的细胞进入斑块,促使斑块的发生发展,破坏斑块的稳定性^[11]。

本实验证实,活血胶囊可以抑制高脂血症兔主动脉 VEGF, VCAM-1 的表达,说明它在降血脂的同时还可以抑制血管新生和减轻血管壁的炎症反应,具有多方面的抗 AS 作用,有一定的临床应用价值;但作为一种中成药,其作用可能是多方面的,值得进一步的探讨。

[参考文献]

[1] 郗杨. 斑块内新生血管的作用及应对[J]. 国际心血管病杂志, 2014(41):14.
[2] Nishikawa R, Cheng S Y, Nagashima R, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human brain tumor [J]. Acta Neuropathol, 1998,

96:453.
[3] 孟晓萍. 动脉粥样硬化[M]. 北京:人民卫生出版社,2011.
[4] 彭宁,刘勤社,梁磊,等. 冠脉粥样硬化患者 AR 中医证型分布及活血胶囊对血瘀型 AR 的干预作用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011;10(3):61.
[5] 毛阿娟. 活血胶囊体内效应物质基础研究[D]. 西安:西北大学,2012:6.
[6] Raman K G, Gandley R E, Rohland J. Early hypercholesterolemia contributes to vasomotor dysfunction and injury associated atherogenesis that can be inhibited by nitric oxide[J]. J Vasc Surg, 2011, 53(3):754.
[7] Sweazea K L, Walker B R. High fat feeding impairs endothelin-1 mediated vasoconstriction through increased inos-derived nitric oxide[J]. Horm Metab Res, 2011, 43(7):470.
[8] 肖展翅. 急性脑梗死患者颈动脉粥样硬化斑块的稳定性与血管内皮功能的相关性研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2013;14(6):452.
[9] Chen Y H, Lin S J, Ku H, et al. Salvianolic acid B attenuates VCAM-1 and ICAM-1 expression in TNF- α -treated human aortic endothelial cells [J]. Cell Biochem, 2001, 82(3):512.
[10] Obrien K D, Allen M D, McDonald T O. Vascular cell adhesion-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques; implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis [J]. J Clin Invest, 1998, 92(2):945.
[11] 王健,黄午阳,郑其升,等. TNF- α 对人脐静脉内皮细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2013;46(8):1179.

[责任编辑 聂淑琴]